

2/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009797520

WPI Acc No: 1994-077373/ 199410

Novel peptide(s) with Transforming Growth Factor-beta activity - useful
for treating wounds, osteoporosis, rheumatoid arthritis, etc.

Patent Assignee: KURARAY CO LTD (KURS)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6025288	A	19940201	JP 92207501	A	19920710	199410 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92207501 A 19920710

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6025288	A	9	C07K-007/08	

Abstract (Basic): JP 6025288 A

The peptide or the salt of formula
H-X1-Ala-X2-Pro-Cys-Cys -Val-X3-Gln-X4 -Leu-Glu-X5-Y (I)
having TGF-beta activity is new.

In (I), X2 = Ser or Ala, X3 = Ser or Pro, X4 = Ala or Asp, X1, X5 =
peptide fragment composed of 1-5 amino acid residue of Gly, Ala, Val,
Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle or Ile,
or a single bond and Y = OH or amino.

Also claimed is a peptide or salt of formula H-X6-A-X7-Y (II)
having TGF-beta activity. In (II) A = the peptide fragment Ala Ala Pro
Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu, Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp
Leu Glu, or Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu. X7 = the
peptide fragment composed of 1-5 aminoacid residue of Gly, Ala, Val,
Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle or Ile,
or a single bond.

Six peptides are specifically claimed, e.g. Asn-Pro-Gly-Ala-Ser
-Ala-Ala-Pro-Cys-Cys- Val-Pro-Gln-Ala-Leu-Glu and
Asn-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Ser-Ala-Ser- Pro-Cys-Cys-Val-Ser
-Gln-Asp-Leu-Glu- Pro-Leu-Thr-Ile-Leu.

USE - The peptides are useful for the treatment of fracture, wound,
multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, metatypical arthrosis,
osteoporosis and periodontitis. They can suppress the rejective reaction
after transportation.

Dwg.0/0

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-007/08

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-007/06;
C07K-007/10; C07K-099-00

2/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009797520

WPI Acc No: 1994-077373/ 199410

Novel peptide(s) with Transforming Growth Factor-beta activity - useful
for treating wounds, osteoporosis, rheumatoid arthritis, etc.

Patent Assignee: KURARAY CO LTD (KURS)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6025288	A	19940201	JP 92207501	A	19920710	199410 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92207501 A 19920710

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6025288	A	9	C07K-007/08		

Abstract (Basic): JP 6025288 A

The peptide or the salt of formula
H-X1-Ala-X2-Pro-Cys-Cys -Val-X3-Gln-X4 -Leu-Glu-X5-Y (I)
having TGF-beta activity is new.

In (I), X2 = Ser or Ala, X3 = Ser or Pro, X4 = Ala or Asp, X1, X5 =
peptide fragment composed of 1-5 amino acid residue of Gly, Ala, Val,
Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle or Ile,
or a single bond and Y = OH or amino.

Also claimed is a peptide or salt of formula H-X6-A-X7-Y (II)
having TGF-beta activity. In (II) A = the peptide fragment Ala Ala Pro
Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu, Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp
Leu Glu, or Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu. X7 = the
peptide fragment composed of 1-5 aminoacid residue of Gly, Ala, Val,
Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle or Ile,
or a single bond.

Six peptides are specifically claimed, e.g. Asn-Pro-Gly-Ala-Ser
-Ala-Ala-Pro-Cys-Cys- Val-Pro-Gln-Ala-Leu-Glu and
Asn-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Ser-Ala-Ser- Pro-Cys-Cys-Val-Ser
-Gln-Asp-Leu-Glu- Pro-Leu-Thr-Ile-Leu.

USE - The peptides are useful for the treatment of fracture, wound,
multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, metatypical arthrosis,
osteoporosis and periodontitis. The can suppress the rejective reaction
after transportation.

Dwg.0/0

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-007/08

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-007/06;
C07K-007/10; C07K-099-00

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-25288

(43)公開日 平成6年(1994)2月1日

(51)Int.Cl.⁵
C 07 K 7/08
ZNA 7537-4H
7/06 Z 8318-4H
7/10 7537-4H
// A 61 K 37/02 ABG
ABJ

識別記号 庁内整理番号 FI

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3(全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-207501

(71)出願人 000001085

(22)出願日 平成4年(1992)7月10日

株式会社クラレ
岡山県倉敷市酒津1621番地

(72)発明者 谷原 正夫

岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社
クラレ内

(72)発明者 藤原 千絵

岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社
クラレ内

(54)【発明の名称】 ベブチドまたはその塩

(57)【要約】

【構成】 下記の一般式

H-X↑1-Ala-X↑2-Pro-Cys-Cys-Val-X↑3-
Gln-X↑4-Leu-Glu-X↑5-Y

(式中、X↑1はSerおよびAlaよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3はSerおよびProよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4はAlaおよびAspよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1およびX↑5はそれぞれ単結合またはGly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Gln、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、NleおよびIleよりなる群から選ばれる1～5個のアミノ酸残基よりなるベブチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す)で示され、かつTGF-β様活性を有するベブチドまたはその塩。

【効果】 骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

れるペプチドまたはその塩は、TGF- β 様活性を有することから、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

【0002】

【従来の技術】TGF (トランスフォーミング グロウス ファクター transforming growth factor) - β は、非腫瘍細胞に腫瘍細胞的性質を発現させる腫瘍由来因子として発見され、その後、血小板、マクロファージ、骨、腎臓などの正常組織にも発見された（臨床免疫、第24巻、第146頁（1992年）参照）。活性型のTGF- β は分子量が約25kDのホモダイマーとして存在し（プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズオブ ザ ユナイテッドステイツ オブ アメリカ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.）、第85巻、第4715頁（1988年）参照），ラットの正常線維芽細胞であるNRK-49F株に対して可逆的に形質転換を引き起こし、軟寒天培地での増殖を促進する作用を有するが、その他多くの細胞に対しては増殖抑制因子として作用することが明らかになっている（カレント トピックス イン ディベロッメンタル バイオロジー（Current Topics in Developmental Biology）、第24巻、第95頁（1990年）参照）。

【0003】TGF- β は血管の新生を促進し、かつ細胞外基質蛋白質の合成を促進することから、骨折の接合作用または創傷治癒効果を有すると考えられる（サイエンス（Science）、第237巻、第1333頁（1987年）参照）。また、TGF- β は強力な免疫抑制作用をもつことか

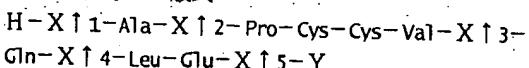
30 ら、臓器移植後の拒絶反応を抑制することが報告されている（プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ ユナイテッドステイツ オブ アメリカ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.）、第87巻、第1591頁（1990年）参照）。さらに、TGF- β はリウマチ性関節炎の患者の関節液中に存在し、強力な炎症性メディエータであるIL-1の作用を中和することが報告されている（ザ ジャーナル オブ イムノロジー（J. Immunol.）、第145巻、第2514頁（1990年）参照）。また、TGF- β は in vivo で骨形成を促進することから、骨粗鬆症または歯周炎の治療に有用であると考えられ（実験医学、第8巻、第345頁（1990年）参照）、実験的多発性硬化症モデル動物の発症を抑制することも報告されている（プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ ユナイテッドステイツ オブ アメリカ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.）、第88巻、第2918頁（1991年）参照）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のTGF- β は、分子量が大きいことから免疫原性が高く、反復投与によ

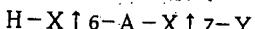
【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式



（式中、X↑2はSerおよびAlaよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑3はSerおよびProよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑4はAlaおよびAspよりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、X↑1およびX↑5はそれぞれ単結合またはGly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、NleおよびIleよりなる群から選ばれる1～5個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す。）で示され、かつTGF- β 様活性を有するペプチドまたはその塩。

【請求項2】 一般式



（式中、Aは式（1）：Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu（配列番号：1）で示されるペプチド断片、式（2）：Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu（配列番号：2）で示されるペプチド断片または式（3）：Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu（配列番号：3）で示されるペプチド断片を表し、X↑6およびX↑7はそれぞれ単結合またはGly、Ala、Val、Arg、Asn、Ser、Phe、Pro、Leu、Glu、Asp、Lys、Thr、His、Tyr、NleおよびIleよりなる群から選ばれる1～5個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Yは水酸基またはアミノ基を表す。）で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

【請求項3】 下記の

- 式（4）：Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu（配列番号：4）、
- 式（5）：Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val（配列番号：5）、
- 式（6）：Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu（配列番号：6）、
- 式（7）：Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val（配列番号：7）、
- 式（8）：Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu（配列番号：8）または
- 式（9）：Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu（配列番号：9）

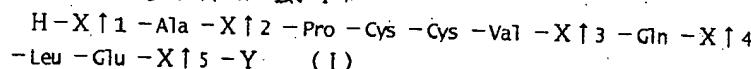
で示される請求項1記載のペプチドまたはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はTGF- β 様活性を有するペプチドまたはその塩に関する。本発明により提供さ

りアナフィラキシーショックを引き起こす虞れがある。また生体内に投与しても数分内に血中から消失し、有効性が失われる。また大量に投与することにより、肝臓および腎臓に対する毒性、非特異的な免疫抑制などの種々の副作用が発現する可能性がある。しかるに、本発明の目的は、TGF-βよりも副作用が少なく、かつ強いT*



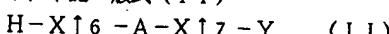
(式中、 $X\uparrow 2$ は Ser よりも Ala よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、 $X\uparrow 3$ は Ser よりも Pro よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、 $X\uparrow 4$ は Ala よりも Asp よりなる群から選ばれるアミノ酸残基を表し、 $X\uparrow 1$ や $X\uparrow 5$ はそれ自身単結合または Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle よりなる群から選ばれる 1~5 個のアミノ酸残基よりなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す) で示されるペプチドまたはその塩を提供することによって達成される。

【0006】本明細書においては各種アミノ酸残基を次の略号で記述する。

Ala : L-アラニン残基
Arg : L-アルギニン残基
Asn : L-アスパラギン残基
Asp : L-アスパラギン酸残基
Cys : L-システイン残基
Gln : L-グルタミン残基
Glu : L-グルタミン酸残基
Gly : グリシン残基
His : L-ヒスチジン残基
Ile : L-イソロイシン残基
Leu : L-ロイシン残基
Lys : L-リシン残基
Phe : L-フェニルアラニン残基
Pro : L-プロリン残基
Ser : L-セリン残基
Thr : L-トレオニン残基
Trp : L-トリプトファン残基
Tyr : L-チロシン残基
Val : L-バリン残基

Nle : L-ノルロイシン残基
また、本明細書においては、常法に従ってペプチドのアミノ酸配列を、その N 端のアミノ酸残基が左側に位置し、C 端のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。

【0007】上記一般式 (I) で示されるペプチドのうち、下記一般式 (II)

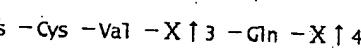


(式中、A は式 (I) : Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 1) で示されるペプチド、50

* G F - β 様活性を有するペプチドを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、上記の目的は、下記の一般式 (I)



断片、式 (2) : Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 2) で示されるペプチド断片または式 (3) : Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu (配列番号: 3) で示されるペプチド断片を表し、 $X\uparrow 6$ や $X\uparrow 7$ はそれぞれ単結合または Gly, Ala, Val, Arg, Asn, Ser, Phe, Pro, Leu, Glu, Asp, Lys, Thr, His, Tyr, Nle よりなる群から選ばれる 1~5 個のアミノ酸残基からなるペプチド断片を表し、Y は水酸基またはアミノ基を表す) で示されるペプチドが好ましい。

【0008】本発明により提供されるペプチドの代表例を次に示す。

式 (4) : Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu (配列番号: 4)、

式 (5) : Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 5)、

式 (6) : Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6)、

式 (7) : Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7)、

式 (8) : Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) や

式 (9) : Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9)。

【0009】本発明のペプチドの塩は生理学的に許容される塩であり、その塩としては、例えば、塩酸、硫酸、磷酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、バルミチン酸などの酸との塩；ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物または炭酸塩との塩；トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、t-ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどとの塩などが挙げられる。

【0010】本発明のペプチドは、ペプチドの合成において通常用いられる方法、例えば固相合成法または液相合成法によって調製されるが、固相合成法が操作上簡便である（例えば、日本生化学会編「統生化学実験講座 2 タンパク質の化学（下）」、第 641~694 頁（昭和 62 年 5 月 20 日 株式会社東京化学同人発行）参照）。

【0011】本発明のペプチドの固相合成法による調製は、例えば、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体などの反応溶媒に不溶性である重合体に目的とするペプチドのC末端に対応するアミノ酸をそれが有する α -COOH基を介して結合させ、次いで該アミノ酸に目的とするペプチドのN末端の方向に向かって、対応するアミノ酸またはペプチド断片を該アミノ酸またはペプチド断片が有する α -COOH基以外の α -アミノ基などの官能基を保護したうえで縮合させて結合させる操作と、該結合したアミノ酸またはペプチド断片における α -アミノ基などのペプチド結合を形成するアミノ基が有する保護基を除去する操作とを順次繰り返すことによってペプチド鎖を伸長させ、目的とするペプチドに対応するペプチド鎖を形成し、次いで該ペプチド鎖を重合体から脱離させ、かつ保護されている官能基から保護基を除去することにより目的とするペプチドを得、次いでこれを精製することによって実施される。ここで、ペプチド鎖の重合体からの脱離および保護基の除去は、フッ化水素を用いて同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。また、得られたペプチドの精製は逆相液体クロマトグラフィーで行うのが効果的である。

【0012】また、本発明のペプチドの塩は、通常の塩生成反応を利用することにより調製される。

【0013】後述の試験例から明らかなことより、本発明のペプチドおよびその塩（以下、これらをペプチド類と略称する）は、TGF- β 様活性を有し、かつ毒性試験において低毒性であることが確認されている。

【0014】以上の結果から、本発明のペプチド類は骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの治療に有用である。また、本発明のペプチド類は、臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制する。

【0015】本発明のペプチド類は、骨折、創傷、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病、多発性硬化症などの患者に投与することにより、上記権患者の症状を軽減することができる。

【0016】ペプチド類の有効な活性発現のための投与量は、疾病、患者の重篤度、薬物に対する忍容性などにより異なるが、通常成人1日当たり、0.01 μ g/kg～2g/kgであり、好ましくは0.01 μ g/kg～200mg/kgである。

【0017】投与形態としてはペプチド類を5%ブドウ糖液や生理食塩水などの生理学的に許容し得る溶液に溶解させて得られる溶液が好ましく、また該溶液は薬理学的に許容される種々の添加剤を含んでいてもよい。

【0018】投与方法としては静脈投与、皮下投与、腹腔投与、関節内投与、経皮投与などが挙げられ、さらにペプチド類をカプセル化またはリボソーム化することにより経口投与も可能である。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0020】実施例1

式(4) : Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala LeuGlu (配列番号: 4) で示されるペプチドをペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-[N-(t-ブトキシカルボニル)-アーベンジル-L-グルタミルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を0.70ミリモル/g（樹脂）の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 9.9対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAMグルタミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzI)〕0.1ミリモルを用い、ペプチドのN端に向かって順次アミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN-[α -(t-ブトキシカルボニル)-L-グルタミン〔t-Boc グルタミン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-ロイシン〔t-Boc ロイシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-プロリン〔t-Boc プロリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-グリシン〔t-Boc グリシン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-アスパラギン〔t-Boc アスパラギン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-O-ベニジル-L-セリン〔t-Boc セリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-S-(p-メトキシベンジル)-L-システイン〔t-Boc システイン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-バリン〔t-Boc バリン〕、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-アラニン〔t-Boc アラニン〕をそれぞれ1ミリモル用いた。

【0021】得られたペプチドについて株式会社ペプチド研究所製のHF反応装置Ⅰ型を用いて脱保護と固相からの脱離を行った。粗生成物をミリポア・ウォーターズ社製分取用高速液体クロマトグラフ〔カラム: デルタパックC18 4.7×300mmプレップパック1000加圧モジュール付〕で精製した。得られた精製ペプチドを島津製作所株式会社製LC6A分析用高速液体クロマトグラフ〔カラム: 東ソ-株式会社製TSKgel OD S-80TM CTR、移動相: トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水の混合溶媒（アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50容量%に変化させた）〕に付したところ、18.8minに单一のピークが示された。FAB法マススペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は1527であった（理論値: 1527.72）。

【0022】実施例2～6および比較例1

式(5) : Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu

Glu Pro Leu Pro IleVal (配列番号: 5) で示される

50 ペプチド（実施例2）、式(6) : Ala Pro Glu Ala Se

r Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu (配列番号: 6) で示されるペプチド (実施例 3)、式 (7) : Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val (配列番号: 7) で示されるペプチド (実施例 4)、式 (8) : Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu (配列番号: 8) で示されるペプチド (実施例 5)、式 (9) : Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Leu (配列番号: 9) で示されるペプチド (実施例 6)、および式 (10) : Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser (配列番号: 10) で示されるペプチド (比較例 1) を実施例 1 と同様の方法により合成した。

【0023】実施例 2 および実施例 4 では 4-[N-(t-ブトキシカルボニル)-L-パリルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を 0.68 ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99 対 1] からなる粒状樹脂 [米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAM パリン、t-Boc-L-Val] 0.1 ミリモルを用い、実施例 3 では 4-[N-(t-ブトキシカルボニル)- α -ベンジル-L-グルタミルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を 0.70 ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99 対 1] からなる粒状樹脂 [米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAM グルタミン酸、t-Boc-L-Glu(OBzI)] 0.1 ミリモルを用い、実施例 5 及び実施例 6 では 4-[N-(t-ブトキシカルボニル)-L-ロイシルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を 0.68 ミリモル/g (樹脂) の割合で

有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99 対 1] からなる粒状樹脂 [米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAM ロイシン、t-Boc-L-Leu] 0.1 ミリモルを用い、比較例 1 では 4-[N-(t-ブトキシカルボニル)-O-ベンジル-L-セリルオキシメチル]-フェニルアセトアミドメチル基を 0.72 ミリモル/g (樹脂) の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体 [スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99 対 1] からなる粒状樹脂 [米国アプライド・バイオシステムズ社製、PAM セリン、t-Boc-L-Ser(BzI)] 0.1 ミリモルを用いた。

【0024】また、アミノ酸としては、実施例 1 で用いたものに加えて米国アプライド・バイオシステムズ社製の N-(t-ブトキシカルボニル)-L-(2-プロモベンジルオキシカルボニル)-L-チロシン [t-Boc チロシン]、N-(t-ブトキシカルボニル)-L-イソロイシン [t-Boc イソロイシン]、N-(t-ブトキシカルボニル)- α -ベンジル-L-グルタミン酸 [t-Boc グルタミン酸]、N-(t-ブトキシカルボニル)- β -ベンジル-L-アスパラギン酸 [t-Boc アスパラギン酸]、N \uparrow α -(t-ブトキシカルボニル)-N_{Ind}-ホルミル-L-トリプトファン [t-Boc トリプトファン] を用いた。

【0025】得られたそれぞれのペプチドについて実施例 1 におけると同様にして脱保護と固相からの脱離を行い、粗生成物を精製した。それぞれの精製ペプチドについて、分析用高速液体クロマトグラフにおける溶出時間および FAB 法マススペクトルによる分子量測定結果を第 1 表にまとめて示す。

【0026】

【表 1】

第 1 表

実施例 または 比較例	溶出時間 (min)	精製ペプチド		(理論値)
		式番号	分子量	
実施例 2	23.9	(5)	1620	1620.97
実施例 3	18.0	(6)	1658	1659.79
実施例 4	23.8	(7)	1680	1680.98
実施例 5	25.5	(8)	2112	2115.38
実施例 6	25.0	(9)	2111	2111.39
比較例 1	23.4	(10)	1631	1629.78

【0027】試験例1

コンカナパリンA刺激マウス脾臓細胞の増殖抑制試験
 BALB/cマウス脾臓細胞を、コンカナパリンA：3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2-メルカブトエタノール：50 μM 、牛胎児血清：13%の割合でそれぞれ含有する RPMI-1640培地に分散し、5000個/ウェルの割合で96ウェルプレートに分注し、7%CO₂存在下37°Cで7日間培養した。培養後プロビディウムアイオダイドで生細胞のDNAを標識し、蛍光強度を測定することによ

り生細胞数をカウントした。ペプチドは100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、TGF- β は1 ng/ml の濃度になるようにそれぞれコンカナパリンA刺激直前に添加した。コンカナパリンAを加えないウェルに対するコンカナパリンAのみを加えたウェルの生細胞数の増加を1として、ペプチドまたはTGF- β を加えた時の生細胞数の減少を抑制率として表した。結果を第2表に示す。

【0028】

【表2】

第2表

実施例または比較例	ペプチド	抑制率(%)
—	TGF- β	85
実施例1	式(4)で表されるペプチド	60
実施例2	式(5)で表されるペプチド	70
実施例3	式(6)で表されるペプチド	65
実施例4	式(7)で表されるペプチド	73
実施例5	式(8)で表されるペプチド	70
実施例6	式(9)で表されるペプチド	72
比較例1	式(10)で表されるペプチド	2

【0029】第2表のとおり、TGF- β の抑制率が85%であるのに対して、実施例1～実施例6で得られたペプチドの抑制率は60%～73%であり、本発明のペプチドがTGF- β 様の活性を示すことは明らかである。

【0030】試験例2

軟寒天中のコロニー形成試験

2.5 ng/mlのEGF、10%の牛胎児血清及び0.5%の寒天を含むイーグルのMEM培地にNRK-49F細胞を1000個/シャーレの割合で直径10 cmのシャレに撒き、7%CO₂存在下37°Cで7日間培養した。ニュートラルレッドで生細胞を染色し、コロニー100個あたりの70 μm以上の直径を有するコロニーの割合を求めた。その結果、実施例1で得られたペプチドを300 μg/mlの濃度で添加したときに平均5.8%のコロニーが形成され、何も添加しないコントロールの平均3.3%と比較して有意にコロニー形成が促進された。

【0031】

【発明の効果】本発明により提供されるペプチド類は、骨折、創傷、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、変形性関節症、骨粗鬆症、歯周病などの治療に有効であり、また臓器移植後の拒絶反応を効果的に抑制することができる。

【0032】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列 Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

1 5 10

【0033】配列番号：2

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu

1 5 10

【0034】配列番号：3

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

1 5 10

【0035】配列番号：4

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

13

14

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu

1 5 10 15

【0036】配列番号：5

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val

1 5 10 15

【0037】配列番号：6

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

10*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

Ala Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu

1 5 10 15

【0038】配列番号：7

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★

配列

Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val

1 5 10 15

【0039】配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

☆トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

☆

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

1 5 10 15

Pro Leu Thr Ile Leu

20

【0040】配列番号：9

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

30◆トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

◆

配列

Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu

1 5 10 15

Pro Leu Pro Ile Leu

20

【0041】配列番号：10

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*40

配列

Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser

1 5 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 61 K 37/02

識別記号

ACK

ADA

序内整理番号

8314-4C

F I

技術表示箇所

(9)

特開平6-25288

ADF

C 07 K 99:00